

УДК 576.3.577.12

ВЛИЯНИЕ ПРИРОДНЫХ ПОЛИФЕНОЛОВ НА ИЗОЛИРОВАННЫЕ МИТОХОНДРИИ ДРОЖЖЕЙ *Dipodascus magnusii*

© 2020 г. Д. И. Дергачева¹, О. И. Кляйн¹, Н. Н. Гесслер¹, Е. П. Исакова¹, Ю. И. Дерябина^{1,*},
член-корреспондент РАН А. В. Николаев²

Поступило 20.09.2019 г.
После доработки 20.09.2019 г.
Принято к публикации 20.09.2019 г.

На изолированных митохондриях гриба *Dipodascus (Endomyces) magnusii* проведено исследование влияния стильбеновых полифенолов (ресвератрола и пиносильвина) и флавоноидов (дигидромирицетина, эпигаллокатехина и дигидрокверцетина) на генерацию активных форм кислорода в процессе дыхания. Показано, что ингибирование образования активных форм кислорода стильбеновыми полифенолами связано как с ингибированием потребления кислорода, так и с антиоксидантными свойствами, степень проявления которых зависела от количества гидроксильных групп в молекуле полифенола. Из флавоноидов дигидромирицетин проявлял наибольшую активность в снижении генерации активных форм кислорода, но ингибирующее действие на потребление кислорода митохондриями было значительно ниже, чем у стильбеновых полифенолов. Полученные данные показывают, что механизм снижения генерации активных форм кислорода полифенолами связан как с ингибированием дыхания, так и антиоксидантными свойствами.

Ключевые слова: полифенолы, ресвератрол, пиносильвин, дигидромирицетин, антиоксидантное действие, митохондрии

DOI: 10.31857/S2686738920010059

Одним из типов антиоксидантов, наиболее активно используемых в фармацевтике, являются природные полифенолы растительного происхождения, проявляющие полезные свойства при терапии целого ряда метаболических заболеваний [1]. Полифенолы опосредуют своё защитное действие с помощью нескольких механизмов, которые в настоящее время интенсивно исследуются. Антиоксидантная активность полифенолов реализуется как путём непосредственного гашения свободных радикалов, так и предотвращением их образования путём хелатирования железа. Кроме того, полифенолы способны активировать антиоксидантные ферменты и ингибировать ферменты, продуцирующие активные формы кислорода (АФК) (липоксигеназы, НАДН-оксидазы, ксантинооксидазы) [2]. Наряду с выраженными антиоксидантными свойствами выявлена

способность полифенолов модулировать процесс внутриклеточной передачи сигнала с участием протеинкиназы С и таким образом влиять на различные процессы в клетке [2]. Однако многие аспекты действия полифенолов по-прежнему остаются малоизученными.

Известно, что митохондрии играют фундаментальную роль в процессе поддержания клеточного гомеостаза. Нарушение митохондриальных функций с образованием избыточного количества свободных радикалов наблюдается при некоторых метаболических заболеваниях, включая старение, диабет, канцерогенез, ожирение [3].

Показано, что полифенолы оказывают существенное действие на функции митохондрий. Так, полифенол стильбенового ряда ресвератрол (РСВ) стимулирует экспрессию гена *SIRT1* (НАД-зависимой деацетилазы) и улучшает окисление жирных кислот в митохондриях в условиях дефицита карнитинпальмитоилтрансферазы 2 [4]. Положительное влияние на функции митохондрий как в системе *in vitro*, так и в опытах *in vivo* оказывают и другие природные полифенолы — мирицитрин, кверцетин, лютеолин, эпигаллокатехин галлат [5, 6]. Было обнаружено, что проан-

¹ Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, ФИЦ «Биотехнологии РАН», Москва, Россия

² Институт физики Земли им. О.Ю. Шмидта Российской Академии наук, Москва, Россия

*e-mail: yul_der@mail.ru

тоцианидины также могут смягчать митохондриальные дисфункции, индуцированные пероксидом водорода, за счёт поддержания мембранного потенциала и работы цепи переноса электронов и подавления продукции кислородных радикалов митохондриями [7]. Биофлавоноид гесперидин улучшает ферментативный статус комплексов I–IV цепи переноса электронов [8]. Однако помимо позитивного воздействия полифенолов на митохондриальные функции отмечено и противоположное действие этих соединений на органеллы, связанное с общим нарушением биоэнергетики и запуском апоптозных реакций [9]. Точный механизм, посредством которого природные полифенолы модулируют функции и динамику митохондрий, остаётся неизвестным.

В данной работе изолированные митохондрии дрожжевых организмов, являющихся прекрасной экспериментальной моделью эукариотической клетки, использовались для выявления механизмов антиоксидантного действия стильбеновых и флавоноидных полифенолов. В качестве объекта исследования использовали дрожжеподобные грибы *Dipodascus (Endomyces) magnusii*, штамм ВКМ У-261. Клетки дрожжей выращивали на полусинтетической среде с глицерином (1%) в качестве основного источника углерода, как описано в [10]. Биомассу собирали на поздней логарифмической стадии роста (10–13 г сырого веса на 1 л культуральной среды). Выделение митохондрий осуществляли по методу, описанному ранее [10].

Принимая во внимание тот факт, что митохондриальный компартмент клетки, а именно комплексы I и III цепи переноса электронов, является основным источником свободных радикалов в клетке, на первом этапе работы был исследован уровень АФК в митохондриальной суспензии. Для оценки этого показателя в присутствии полифенолов ресвератрола (РСВ), пиносильвина (ПС), диgidромирицетина (ДГМ), эпигаллокатехина (ЭГК) и диgidрокверцетина (ДГК) (рис. 1) при помощи флуоресцентного красителя Amplex Red (AR) (стоковый 10 мМ раствор в ДМСО) митохондрии добавляли в среду для исследования дыхательной активности, содержащую 600 мМ маннит; 20 мМ Tris-HCl, pH 7.4; 0.2 мМ K_2HPO_4 ; 20 мМ пируват + малат; 0.4 мг/мл митохондриального белка. Затем разносили митохондриальную суспензию по лункам 96-луночного иммунологического планшета для флуоресцентных исследований. Туда же вносили экспериментальные образцы полифенолов в концентрации 10 мкМ, после чего добавляли Amplex Red (Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit, “Sigma”) в конечной концентрации 25 мкМ. Реакцию запускали внесением в реакционную среду пероксидазы хрена ($\text{RZ} = 0.6 = 150\text{--}170$ ед/мг), применяя стоковый раствор с концентрацией 0.2 мг/мл. Измерение флуоресценции при длине

волны $\lambda = 590 \pm 25$ нм при возбуждении $\lambda = 530 \pm 35$ нм проводили на фотометре-флуориметре Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader “BeoTek” (США) в течение 15 мин с последующим анализом данных в программе Microsoft Excel.

Результаты исследований представлены на рис. 2. Как видно, базовый уровень продукции АФК в митохондриях дрожжей *D. magnusii* оказался довольно высоким – более 280 тыс. относительных единиц флуоресценции (рис. 2). Внесение природных полифенолов в концентрации 10 мкМ приводило к уменьшению генерации АФК: в случае РСВ на 65%, ПС и ДГМ примерно на 30%, ЭГК и ДГК на 15% (рис. 2).

Известно, что некоторые полифенолы и, в частности, наиболее изученный РСВ способны непосредственно взаимодействовать с компонентами электрон-транспортной цепи и регулировать F_0F_1 -АТФаза/АТР-синтазную активность [11], уменьшая скорость поглощения кислорода митохондриями животных. Для более детального исследования эффектов полифенолов на изолированных митохондриях дрожжей мы оценивали действие соединений, проявивших наибольшую эффективность в подавлении образования АФК (РСВ, ДГМ и ПС), на дыхательную активность и параметры сопряжения органелл. Потребление кислорода митохондриальной суспензией измеряли полярографически *in vitro* при 25°C в ячейке с электродами, закрытыми фторопластовой плёнкой, с постоянной разностью потенциалов 660 мВ. Результаты экспериментов представлены в табл. 1. Как и в исследовании по генерации АФК в митохондриальной суспензии, все протестированные полифенолы продемонстрировали подавление дыхательной активности митохондрий (табл. 1). РСВ, ингибирующий скорость дыхания в состоянии до добавления АТФ (состояние 4) более чем в 3 раза и скорость дыхания в состоянии после добавления АТФ (состояние 3) более чем в 5 раз оказался наиболее эффективным. Внесение ПС также уменьшало скорость дыхания митохондрий примерно в 3 и 4 раза в состоянии 4 и 3 соответственно (табл. 1). В то же время ДГМ, уменьшающий уровень генерации АФК в той же степени, что и ПС (рис. 2), ингибировал дыхательную активность митохондрий дрожжей примерно на 20% (табл. 1). Интересно отметить, что параметры сопряжения (показатели дыхательных контролей) в присутствии ДГМ улучшались на 25 и 9%, при добавлении ПС – снижались на 20 и 33% в случае DK_L и DK_{Ch} , соответственно, в то время как при внесении РСВ они практически не изменялись (табл. 1).

Ранее на изолированных митохондриях мозга было выявлено ингибирование поглощения кислорода в присутствии РСВ [11]. Поскольку полифенол не блокировал активность комплекса IV,

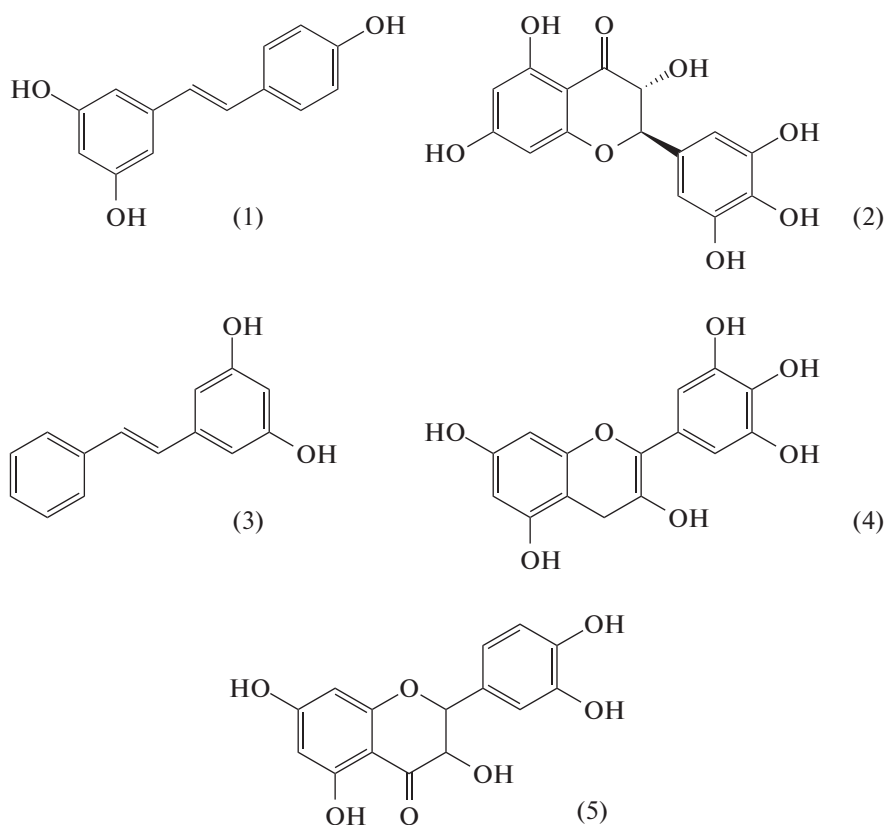


Рис. 1. Структурные формулы полифенолов: ресвератрола (1); дигидромирицетина (2); пиносильвина (3); эпигаллокатехина (4); дигидрокверцетина (5).

авторы заключили, что его действие может быть связано с блокированием участка между комплексами I и III. В этом контексте Дескирет-Думас и соавт. [12] продемонстрировали, что низкие концентрации РСВ модулируют отношение НАД⁺/НАДН за счёт увеличения активности работы I комплекса в митохондриях печени. ДГМ оказывает антиоксидантное действие при индуцированном окислительном стрессе в эндотелиальных клетках человека HUVECs [13]. Однако механизм его действия на изолированные митохондрии также остаётся предметом дискуссий.

Наши результаты продемонстрировали, что природные полифенолы РСВ, ПС и ДГМ также способны ингибировать скорости поглощения кислорода митохондриями дрожжевых грибов *D. magnusii*. Можно предположить, что уменьшение уровня генерации АФК в присутствии этих метаболитов (рис. 2) обусловлено уменьшением скорости дыхания митохондрий в состоянии 4 (табл. 1). Аналогичные данные были получены в работе [14], свидетельствующей об уменьшении продукции перекиси водорода за счёт уменьшения скорости дыхания митохондрий в состоянии 4 под действием РСВ, однако точный механизм этого явления не был объяснён. Более того, нель-

зя исключить непосредственное антиоксидантное действие полифенолов на митохондриальные компоненты.

Положение и количество гидроксильных групп в бензольном кольце полифенолов может играть ключевую роль в проявлении их антиоксидантных свойств [15]. Полученные в работе ре-

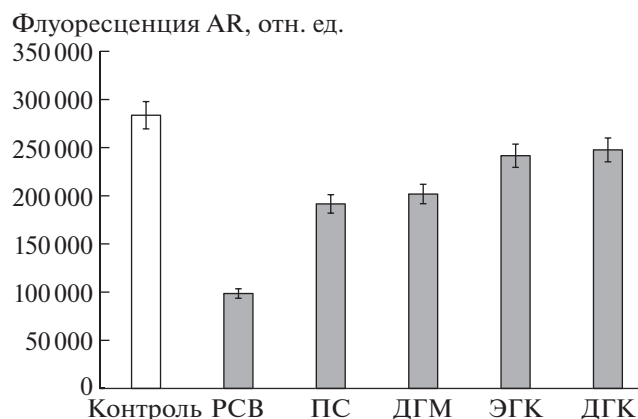


Рис. 2. Влияние полифенолов на скорость генерации АФК (перекиси водорода) *in vitro* митохондриями дрожжей *D. magnusii*.

Таблица 1. Дыхательная активность изолированных митохондрий дрожжей *D. magnusii* в присутствии полифенолов

Экспериментальный вариант	V ₄ , нг-атом О мин ⁻¹ мг белка ⁻¹	V ₃ , нг-атом О мин ⁻¹ мг белка ⁻¹	ДК _L **	ДК _{Ch} ***
Контроль	57.2 ± 9.0	222.2 ± 31.2	3.8 ± 0.3	4.4 ± 0.1
РСВ*	18.0 ± 0.7	40.0 ± 11.2	3.9 ± 0.1	3.7 ± 0.2
ПС*	19.2 ± 3.7	57.2 ± 15.2	3.1 ± 0.1	2.9 ± 0.7
ДГМ*	43.7 ± 3.7	200.0 ± 9.2	4.8 ± 0.3	4.8 ± 0.3

* полифенолы добавлены в концентрации 15 мкМ;

**ДК_L – дыхательный контроль по Ларди;

***ДК_{Ch} – дыхательный контроль по Чансу.

зультаты показали, что стильбеновые полифенолы РСВ и ПС, демонстрирующие сходное ингибирование дыхательной активности изолированных митохондрий (табл. 1), в разной степени влияли на скорость генерации АФК (рис. 2), что, вероятно, обусловлено наличием дополнительной гидроксильной группы в молекуле РСВ. Среди сходных по своей структуре исследованных флавоноидов ДГМ, обладающий тремя гидроксильными группами в бензольном кольце Б, был эффективнее как ЭГК с таким же строением кольца Б, так и ДГК, содержащего два гидроксильных остатка в бензольном кольце Б, хотя и в оптимальном для взаимодействия с АФК орто-положении [19]. Учитывая менее выраженную способность ДГМ ингибировать интенсивность митохондриального дыхания по сравнению со стильбеновыми полифенолами, можно предположить, что его антиоксидантное действие в основном обусловлено непосредственным взаимодействием с АФК.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ (соглашение № 14.616.21.0083, уникальный идентификатор проекта RFMEFI61617X0083).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Теплова В.В., Исакова Е.П., Кляйн О.И. и др. // Прикл. биохим. микробиол. 2018. Т. 54. № 3. С. 215–235. <https://doi.org/10.7868/S0555109918030017>
2. Das J., Ramani R., Suraju O. // Biochim. Biophys. Acta. 2016. V. 1860. P. 2107–2121. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.06.022>
3. Davalli P., Mitic T., Caporali A., et al. // Oxid. Med. Cell Longev. 2016. 23565127. <https://doi.org/10.1155/2016/3565127>
4. Bastin J., Lopes-Costa A., Djouadi F. // Hum. Mol. Genet. 2011. V. 20. № 10. P. 2048–2057. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr089>
5. Cai Z., Zeng W., Tao K., et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2015. V. 458. № 2. P. 227–233. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.01.060>
6. Wang B., Sun J., Ma Y., et al. // J. Food Sci. 2014. V. 79. H1823–H1831. <https://doi.org/10.3390/cells8040287>
7. Zhang Z., Zheng L., Zhao Z., et al. // J. Toxicol. Sci. 2014. V. 39. № 2. P. 803–813. <https://doi.org/10.2131/jts.39.803>
8. Kamaraj S., Anandakumar P., Jagan G., et al. // Fund. Clin. Pharmacol. 2011. V. 25. № 1. P. 91–98. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2010.00812.x>
9. de Oliveira M.R., Nabavi S.F., Manayi A., et al. // Biochim. Biophys. Acta. 2016. V. 1860. № 4. P. 727–745. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.01.017>
10. Deryabina Y., Isakova E., Sekova V., et al. // J. Bioenerg. Biomembr. 2014. V. 46. № 6. P. 479–492. <https://doi.org/10.1007/s10863-014-9582-8>
11. Madrigal-Perez L.A., Ramos-Gomez M. // Int. J. Mol. Sci. 2016. V. 17. № 3. P. 368. <https://doi.org/10.3390/ijms17030368>
12. Desquirit-Dumas V., Gueguen N., Leman G., et al. // J. Biol. Chem. 2013. V. 288. № 51. P. 36 662–36 675. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.466490>
13. Hou X., Tong Q., Wang W., et al. // Life Sci. 2015. V. 130. № 1. P. 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.03.007>
14. Murphy M. // Biochem. J. 2009. V. 417. № 1. P. 1–13. <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>
15. Thavasi V., Bettens R.P., Leong L.P. // J. Phys. Chem. A. 2009. V. 113. № 13. P. 3068–3077. <https://doi.org/10.1021/jp806679v>

**INFLUENCE OF NATURAL POLYPHENOLS ON ISOLATED YEAST
Dipodascus magnusii MITOCHONDRIA****D. I. Dergacheva^a, O. I. Klein^a, N. N. Gessler^a, E. P. Isakova^a,
Y. I. Deryabina^{a,#}, and Corresponding Member of the RAS A. V. Nikolaev^b**^a *Bach Institute of Biochemistry, Fundamental Principles of Biotechnology, Federal Research Center of the RAS, Moscow, Russian Federation*^b *The Schmidt Institute of Physics of the Earth of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*
[#]*e-mail: yul_der@mail.ru*

The effect of stilbene polyphenols (Resveratrol and Pinosilvin) and flavonoids (Dihydromyricetin, Epigallocatechin, and Dihydroquercetin) on producing the reactive oxygen species (ROS) due to cell respiration using the isolated mitochondria of the fungus *Dipodascus (Endomyces) magnusii* was under investigation. It was shown that the inhibition of the ROS generation with stilbenes is related to both the oxygen consumption inhibition and their antioxidant properties. The degree of manifestation of polyphenol antioxidant properties depended on the number of hydroxyl groups in a polyphenol molecule. Of the flavonoids tested, dihydromyricetin was most active in reducing the ROS generation, but its inhibitory effect on oxygen consumption by mitochondria was significantly lower, compared to that of the stilbenes. The data obtained show that the mechanism of reducing the ROS generation with polyphenols is associated with both the respiratory inhibition and their antioxidant properties.

Keywords: polyphenols, resveratrol, pinosilvin, dihydromyretin, antioxidant effect, mitochondria